

丹凤牡丹花遗传毒理学研究

吕燕妮¹, 江志杰^{2*}, 闫文杰³, 段昊³

(1. 国家食品药品监督管理总局行政事项受理服务和投诉举报中心, 北京 100036; 2. 北京市药品检验所, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206; 3. 北京联合大学生物化学工程学院, 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100023)

摘要: **目的** 通过3项致突变实验, 了解丹凤牡丹花的遗传毒性, 并对其安全性做出评价。**方法** 骨髓细胞微核试验: 通过2次经口灌胃小鼠后观察计数含微核PCE数。Ames试验: 利用试验菌株的鼠伤寒沙门氏菌, 氨酸缺陷型4株进行试验, 最终计数各皿回变菌落数。小鼠精子畸形试验: 给予试验样品每日灌胃小鼠, 连续5d, 末次灌胃后30d计数畸形精子数。**结果** 骨髓细胞微核试验、Ames试验、小鼠精子畸形试验结果均为阴性。**结论** 丹凤牡丹花遗传毒性无毒, 安全性较高。

关键词: 丹凤牡丹花; 遗传毒理学; 安全性评价

Study on the genetic toxicology of Danfeng peony

LV Yan-Ni¹, JIANG Zhi-Jie^{2*}, YAN Wen-Jie³, DUAN Hao³

(1. Center for Administrative Matters Receiving Services and Complaints and Reporting, State Food and Drug Administration, Beijing 100036, China; 2. Beijing Key Laboratory of Analysis and Bioassay of Chinese Herbs, Beijing Institute of Drug Control, Beijing 102206, China; 3. Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

ABSTRACT: objective To understand the genotoxicity of Danfeng peony flower by 3 mutagenic experiments and evaluate its safety. **Methods** Micronucleus test of bone marrow cells: The number of micronucleated PCEs was counted by two times of oral gavage mice. Ames test: The test strains of *Salmonella typhimurium*, four strains of acid-deficient type were used for the test, and the number of colonies of each dish was counted. Mouse sperm abnormality test: Mice were intragastrically administered daily for 5 consecutive days, and the number of abnormal sperm was counted 30 days after the last gavage. **Results** The results of micronucleus test of bone marrow cells, Ames test and mouse sperm abnormality test in mice were all negative. **Conclusion** Danfeng peony flower has no genetic toxicity, and has high safety.

KEY WORDS: Danfeng peony; genetic toxicology; safety evaluation

1 引言

牡丹作为我国国花, 其花朵大且颜色鲜艳, 不仅观赏价值高, 还富含淀粉、脂肪、维生素以及多种人体必需氨基酸和微量元素, 而且已有大量研究发现它具有增强免

疫力和抗氧化效果^[1]。据文献记载, 我国山东、河南等地区以牡丹花作为食物的应用

广泛并具有较长的历史, 可追溯到我国宋朝时期, 就已有牡丹花的食用记载^[2], 到了明清时代, 已有了较为成型的以牡丹花作为原料的食品配方和制作方法^[3,4]。随着人

*通讯作者: 江志杰, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为药品检验和方法研究。E-mail: jiangzhijie@126.com

*Corresponding author: JIANG Zhi-Jie, Master, Associate Chief Pharmacist, Beijing Key Laboratory of Analysis and Bioassay of Chinese Herbs, Beijing Institute of Drug Control, Beijing 102206, China. E-mail: jiangzhijie@126.com

们对天然绿色花卉食品的关注, 如今市场上已有用丹凤牡丹为原料开发的产品, 如: 精油、花露以及花茶等^[5-7]。同时牡丹花的食用安全性也引起了学者们的关注^[8], 目前国内关于此方面的报道较少。本研究对丹凤牡丹花遗传毒性进行初步研究, 进而分析该产品在食品领域的应用是否会对人体产生影响, 以期对牡丹花卉能推广应用于食品市场提供一定的研究基础。

2 材料与方 法

2.1 材料、试剂与仪器

丹凤的牡丹花: 取自牡丹种植基地, 洛阳祥和牡丹科技有限公司(河南省)。

实验动物: 体重 25~30 g 的小鼠, 等级 SPF 级。繁殖场所属: 辽宁长生生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2010-0001; 无菌级别的鼠料, 状态为块状。提供商: 北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证号: SCXK(京)2009-0008。

Ames 试验菌株: 氨酸缺陷型 4 株, TA97、TA98、TA100、TA102(哈尔滨医科大学公共卫生学院提供), 检定合格使用。

实验条件: 屏障系统动物实验室, 要求工作照度范围在 200~280 lx; 期间的人工照明时间为 12 h, 黑夜时长 12 h; 室内温度需保持于 (22±1.5) °C; 室内的湿度范围在 50%±10%; 同时, 噪音调控不超过 60 分贝, 实验动物使用许可证号: SYXK(辽)2011-0005。

Leica DMRXA2 型自动生物显微镜(德国 Leica 公司); Sartorius CP4202S-OCE 型、Sartorius CP2202S-OCE 型电子天平(感量 0.0001g, 北京普析通用仪器有限责任公司); Avanti JXN-30/26 离心机(贝克曼库尔特公司); HL-ZS 型断头器(北京合力科创科技发展公司)。

实验用水为蒸馏水。

2.2 方 法

2.2.1 样品预处理

新鲜牡丹花适量, 保留花瓣的基础上, 摘除花蕊, 包括花药花丝、柱头以及子房等, 冲洗片刻沥干水, 再经脱水除去部分水分, 揉捏片刻放于干燥、最后包装、灭菌结束, 初步获得实验所需的干牡丹花样品^[7]。取 23 kg 样品, 230 L 蒸馏水, 水温条件 85 °C, 浸泡 30 min 后过滤, 再次加入同体积去离子水重复后续相同条件操作 1 次得到二次滤液。将 2 次滤液合并, 70 °C 常压水浴浓缩至 23 L, 得到每毫升浓缩液所含样品量为 1 g, 以浓缩液作为受试物。

2.2.2 Ames 试验

根据毒性测定结果, 试验设 5.000、1.000、0.200、0.040、0.008 mg/皿 5 个剂量组。分别取样品 2500、500、100、20、4 mg, 分别加蒸馏水至 50 mL, 样品配制浓度为 50.0、10.0、2.0、0.4、0.08 mg/mL。样品经 0.103 MPa(121 °C)

灭菌 20 min 后使用, 同时设阳性对照组、样品溶剂对照组和未处理对照组。在顶层培养基中加入 0.1 mL 试验菌株增殖菌液、0.1 mL 试验用样品溶液和 0.5 mL S-9 混合液, 混匀后倒入底层培养基平板上, 每个剂量 3 个平皿。在 (37±1) °C 培养 48 h, 计数每皿回变菌落数。剂量组回变菌落数与样品溶剂对照组相比增加一倍以上, 并具有剂量-反应关系者判定为阳性^[9]。整套试验在相同条件下重复做 1 次。

2.2.3 骨髓细胞微核试验

试验 2 次经口方式灌胃, 隔 24 h 操作。将 50 只小鼠 50 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。具体实验步骤如下: 试验的剂量有: 20.00 g/kg bw, 制取过程是取浓缩液 50 mL, 加入去离子水, 定容于 100 mL 制得第一份剂量, 同理缩小第一份浓缩液体积一半, 以相同步骤制得第二份剂量为 5.00 g/kg bw, 样品配制浓度为 1.00 mol/mL, 再逐次缩小一半, 继得到 0.50 mol/mL、0.25 mol/mL, 注意现配现用, 否则增大试验误差。阳性对照组: 40 mg/kg bw 的环磷酸酰胺, 方式给药选择腹腔注射。阴性对照择样品溶剂, 20 mL/kg bw 的灌胃量注入。最后一次受样 6 h 结束再处死小鼠, 摘出小鼠胸骨的骨髓部位, 用小牛血清稀释, 涂片。经过甲醇溶液固定、Giemsa 染色、油镜状态下观察计数。所需计数的数据有嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE)和成熟红细胞数(normochromatic erythrocyte, NCE)。试验最后每只实验小鼠, 观察 PCE, 数量超过 1000 为佳, 计数含微核的 PCE 数目, 计算微核细胞率(计算结果以千分率计)。每只还要观察 PCE 至 200, 计数 NCE 数, 计算所需的 PCE/NCE^[10]。

2.2.4 小鼠精子畸形试验

以随机法将雄性小鼠(25 只)分成 5 组, 选取对象需性发育成熟, 体重范围处于在 25~35g 为佳。实验设计过程: 首先, 设剂量组为 20.00 g/kg bw, 使用浓缩原液, 加去离子水至 100 mL 配制得到。同理再逐次减少一半剂量, 重复上述过程即获得后 2 组剂量为 10.00 g/kg bw 和 5.00 g/kg bw, 注意配制需依次使用 50 mL、25 mL 浓缩液制取, 样品浓度为 1.00 mol/mL, 后 2 组再逐次减少一半制取, 继而有 0.50 mol/mL、0.25 mol/mL, 新鲜配用。其次, 阳性对照以剂量为 40 mg/kg bw 的环磷酸酰胺以腹腔注射的方式给药。阴性对照: 以 20 mL/kg bw 剂量, 灌胃方式, 逐日给予样品溶剂一次, 时长 5 d。第 30 d 的末灌胃终止, 处死小鼠, 取附睾, 制片^[11]。为观察清晰使用伊红溶液处理玻片。每个小鼠计数结构完整、畸形的精子数, 前者需计数 1000 用于计算, 后者以百分率方式计算精子的畸形率。

2.2.5 统计学方法

结果处理使用 SPSS 17.0 χ^2 检验进行统计处理。

3 结果与分析

3.1 Ames 试验

通过表 1 及表 2 结果可知, (1) 回变菌落数分析中, 样品溶

剂对照组数据低于未处理对照组数据达一倍以上,同时,各剂量组则均低于样品溶剂对照组达一倍以上。(2) 无剂量-反应关

系。活化系统中,肝微粒体酶存在与否,对实验菌 TA97、TA98、TA100、TA102,最终结果均解释为阴性。本次结果可重复。

表1 第一次 Ames 试验结果
Table 1 Results of the first Ames test

单位:个/皿

名称	剂量/(mg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		
		χ	\pm SD							
样品组	+S9	0.0080	153	14	32	2	157	10	248	12
		0.0400	163	15	34	4	155	16	257	19
		0.2000	141	11	36	5	150	12	247	13
		1.0000	141	13	39	2	158	11	253	10
		5.0000	151	14	35	1	158	17	262	9
		0.0080	144	16	30	3	140	10	237	12
样品组	-S9	0.0400	146	11	28	4	151	16	249	16
		0.2000	139	13	31	2	144	10	240	15
		1.0000	136	16	34	3	148	15	245	14
		5.0000	145	10	29	2	152	15	246	11
2-氨基苄	+S9	0.0100	1190	104	1207	85	640	63		
1,8-二羟基酞	+S9	0.0500							801	61
敌克松	-S9	0.0500	2227	133	720	75			834	47
叠氮钠	-S9	0.0015					2043	139		
未处理对照组	+S9		148	15	38	2	156	14	260	10
未处理对照组	-S9		134	11	33	4	148	12	239	14
溶剂对照组	+S9		158	12	34	2	164	16	253	13
溶剂对照组	-S9		145	10	29	5	150	17	242	12

表2 第二次 Ames 试验结果
Table 2 Results of the second Ames test

单位:个/皿

名称	剂量/(mg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		
		χ	\pm SD							
样品组	+S9	0.0080	157	12	36	4	164	17	258	15
		0.0400	161	11	36	2	161	13	253	12
		0.2000	155	14	41	3	159	14	246	9
		1.0000	147	10	31	2	158	15	261	16
		5.0000	157	13	34	4	162	16	255	13
		0.0080	149	16	33	3	156	14	236	16
样品组	-S9	0.0400	151	10	31	2	152	10	244	11
		0.2000	141	12	33	4	139	9	239	13
		1.0000	140	17	28	2	145	16	249	15
		5.0000	138	10	30	4	157	13	243	13
2-氨基苄	+S9	0.0100	1213	119	1270	110	586	56		
1,8-二羟基酞	+S9	0.0500							762	69
敌克松	-S9	0.0500	2250	128	693	38			746	60
叠氮钠	-S9	0.0015					2170	115		
未处理对照组	+S9		158	16	40	4	157	14	263	10
未处理对照组	-S9		141	11	35	3	139	9	254	15
溶剂对照组	+S9		151	15	37	5	163	14	244	14
溶剂对照组	-S9		140	12	32	3	152	16	239	9

表 3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果
Table 3 Micronucleus test results of mouse bone marrow polychromatic erythrocytes

性别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	观察用 PCE 数/个	具微核 PCE 数/个	微核率/%			观察用 PCE 数/个	PCE/NCE	
					χ	$\pm SD$	P 值		χ	$\pm SD$
雄性	0.00	5	5000	9	1.80	1.10		1000	1.41	0.05
	5.00	5	5000	9	1.80	0.84	1.00	1000	1.36	0.13
	10.00	5	5000	8	1.60	0.89	0.81	1000	1.38	0.19
	20.00	5	5000	11	2.20	1.10	0.65	1000	1.42	0.15
	0.04 g/kg bw(cp)	5	5000	131	26.20	4.21	<0.01	1000	1.16	0.10
雌性	0.00	5	5000	8	1.60	1.14		1000	1.36	0.03
	5.00	5	5000	7	1.40	0.89	0.80	1000	1.42	0.12
	10.00	5	5000	9	1.80	1.10	0.81	1000	1.37	0.13
	20.00	5	5000	8	1.60	0.89	1.00	1000	1.49	0.08
	0.04 g/kg bw(cp)	5	5000	132	26.40	3.36	<0.01	1000	1.23	0.10

注: P 值为 χ^2 检验概率值。

表 4 小鼠精子畸形试验结果
Table 4 Results of mouse sperm abnormality

剂量/(g/kg bw)	动物数/只	观察精子数/个	精子畸形类型					精子畸形合计畸形率/%		
			无钩头/个	无定形头/个	香蕉形头/个	双尾/个	畸形数/个	χ	$\pm SD$	P 值
0.00	5	5000	25	34	29	0	88	1.76	0.59	
5.00	5	5000	25	66	16	1	108	2.16	0.52	0.15
10.00	5	5000	40	38	20	0	98	1.96	0.33	0.46
20.00	5	5000	18	44	32	0	94	1.88	0.66	0.65
0.04g/kg bw (cp)	5	5000	116	136	58	2	312	6.24	1.22	<0.01

注: P 值为 χ^2 的检验概率值。

3.2 小鼠骨髓细胞微核试验

对于各剂量组, 无论是雌鼠还是雄鼠, 两者 PCE/NCE 的比值均处于 1.36~1.49 范围内, 同时, 无明显的样品对两者骨髓细胞引起抑制作用的表现; 在各剂量组中, 将两者骨髓 PCE 微核率同样品溶剂对照组作比较, 并无显著性差异($P>0.05$), 而环磷酰胺组中, 两者存在显著性差异($P<0.01$)。未有明显的样品对两者骨髓细胞染色体产生损伤的作用^[11], 详见表 3。

3.3 小鼠精子畸形试验

通过表 4 得, 在小鼠精子畸形率比较中, 各剂量组与样品溶剂对照组之间无显著性差异($P>0.05$)。而环磷酰胺组与样品溶剂间却有显著性差异($P<0.01$)。未发现有明显的样品对雄性小鼠生殖细胞引起损伤的作用^[12]。

4 结 论

本实验按照《食品安全性毒理学评价程度和方法》对

丹凤牡丹花进行了 Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验, 试验结果均为阴性, 结果表明: 牡丹花遗传毒性是安全的, 结合其他对牡丹花的功能成分和亚慢性毒性研究结果^[13-15], 表明丹凤牡丹花可作为一种安全性较高的功能食品, 其具有良好的食品开发前景。

参考文献

- [1] 田给林, 赵贵红. 牡丹鲜花在食品中的应用现状及展望[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 187-190.
Tan GL, Zhao GH. Food of peony flowers' exploitation and development prospects [J]. 2010, 31(4): 187-190.
- [2] 中国牡丹全书编纂委员会. 中国牡丹全书[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2002.
The Committee of the Chinese Peony. The whole book of Chinese peony [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2002.
- [3] 菏泽地方史志办. 菏泽牡丹志[M]. 香港: 银河出版社, 2004.
Heze Local History Office. Heze peony chronicles [M]. Hongkong: Galaxy Publishing House, 2004.
- [4] 洛阳市志. 牡丹志[M]. 郑州: 中州古籍出版社, 1998.

- Luoyang Chronicles. Peony [M]. Zhengzhou: Zhongzhou Ancient Book Press, 1998.
- [5] 游玉明, 杨帆, 熊运海. 牡丹花的综合利用与开发前景[J]. 北方园艺, 2011(1): 67-69.
- You YM, Yang F, Xiong YH. Comprehensive utilization and development prospect of peony flower [J]. Northern Hort, 2011, (1): 67-69.
- [6] 王新娣, 石晓峰, 王斌利, 等. 牡丹化学成分的研究进展[J]. 中成药, 2018, (1): 171-176.
- Wang XD, Shi XF, Wang BL, *et al.* Progress in the study of the chemical constituents of peony [J]. Chin Pat Med, 2018, (1): 171-176.
- [7] 詹建国. 一种牡丹花茶及其制备方法: 中国, 200610086920.5 [P]. 2006-11-15.
- Zhan JG. A kind of peony flower tea and its preparation method: China, 200610086920.5 [P]. 2006-11-15.
- [8] 谢韬, 范文今, 杨鸿武. 牡丹花的亚慢性毒性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(13): 1868-1870.
- Xie T, Fan WJ, Yang HW. Research on subchronic toxicity of peony flowers [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 24(13): 1868-1870.
- [9] GB 15193.4-2014 食品安全性毒理学评价程序和方法[S].
- GB 15193.4-2014 Procedures and methods for toxicological assessment of food safety [S].
- [10] GB 15193.5-2014 食品安全性毒理学评价程序和方法[S].
- GB 15193.5-2014 Procedures and methods for toxicological assessment of food safety [S].
- [11] GB 15193.7-2014 食品安全性毒理学评价程序和方法[S].
- GB 15193.7-2014 Procedures and methods for toxicological assessment of food safety [S].
- [12] 陈炳卿. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- Cheng BQ. Nutrition and food hygiene [M]. Beijing: People's Health Press, 1995.
- [13] 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2014.
- Health food inspection and evaluation technical specification [M]. Beijing: Ministry of health of People's Republic of China, 2014.
- [14] 张鸣关, 赵红艳, 吴丽芳, 等. 一朵云不同部位营养成分分析及安全性评价[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(15): 12-16.
- Zhang YG, Zhao HY, Wu LF, *et al.* Nutritional components analysis and safety evaluation of different tissues of *Botrychium ternatum*(Thunb.) Sw. [J]. Food Res Dev, 2017, 38(15): 12-16.
- [15] 王斌利, 王新娣, 董颖, 等. 牡丹的食药价值研究进展[J]. 甘肃医药, 2017, 36(2): 96-98.
- Wang BL, Wang XD, Dong Y, *et al.* Research progress on the value of food and medicine of peony [J]. Gansu Med, 2017, 36(2): 96-98.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



吕燕妮, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: lvyanni80@126.com



江志杰, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为药品检验和方法研究。
E-mail: jiangzhijie@126.com